云 南 植 物 研 究 1994; **16** (3): 279—284
Acta Botanica Yunnanica

巨大螺旋藻 PSII 颗粒光合放氧与多肽组成关系的研究

陈国祥 李功藩

(南京师范大学生物系, 南京 210024)

摘要 由常温下培养的巨大螺旋藻(*Spirulina maxima*)制备的细胞、类囊体膜片层、PSII 颗粒均具一定的放氧活性，且随着制备物的纯化，放氧活性逐步提高。二价阳离子 Ca^{2+}对于维持光合膜放氧活性是必需的；PSII 颗粒放氧复合物包含有 12 条多肽，较高等植物多肽组分复杂；类囊体膜多肽组分则极为复杂；盐洗和多肽重组实验表明 55，50，26kD 多肽与外在放氧蛋白组成及功能有关，特别是 55，26kD 多肽是放氧不可缺少的组分。

关键词 巨大螺旋藻，PSII 颗粒，类囊体膜，光合放氧，多肽重组

STUDY ON THE RELATION OF PHOTOSYNTHETIC O_2– EVOLUTION AND POLYPEPTIDE COMPOSITION OF PSII PARTICLES FROM BLUE–GREEN ALGAE SPIRULINA MAXIMA

CHEN Guo–Xiang, LI Gong–Fan

(*Department of Biology, Nanjing Normal University,* Nanjing 210024)

Abstract It has been demonstrated from our study that the preparations of free cells, thylakoid menbranes and PSII particles of the blue–green algae *Spirulina maxima* cultured under normal temperature all kept a great deal of O_2–evolving activities. Meanwhile, the O_2–evolving activities were increased along with the pruification of these preparation. The presence of Ca^{2+} in the isolation medium was essential to photosynthetic O_2–evolution. SDS–PAGE profile indicated that the PSII particles contained 12 polypeptides, hence the composition of PSII polypeptides was more complicated than that of higher plant. The result of experiments of salt–treatment and polypeptides recomstitution suggested that the 55, 50, 26kD polypeptides were closely related to the extrinsic O_2–evolving protein of PSII, especially the 55, 26kD polypeptides were essential to photosythetic O_2–evolution.

Key words *Spirulina maxima,* PSII particle, Thylakoid membrance, Photosynthetic O_2–evolution, Polypeptides reconstitution

原核的蓝绿藻由于其光合放氧能力较强，并且在植物进化过程中所处的重要地位，目前已成为研究光合放氧机理经常采用的材料。但由于其结构的原始性，胞壁极难破碎，在制备膜颗粒过程中，其放氧

1993-01-17 收稿, 1993-04-14 修回

活性极易丧失，因而对其放氧复合物结构的组成的研究并不象高等植物研究深入。目前用于研究光合放氧机理的蓝绿藻仅限于少数几种嗜温的种类，对常温下生长的蓝绿藻光合放氧机理的研究则鲜见，并且大都是从藻体水平进行的初步研究。本实验试图从膜层次及PSII颗粒水平，选择常温下生长的高放氧性活的巨大螺旋藻（*Spirulina maxima*）为实验材料，探讨其光合放氧与多肽组成的关系，以便为进一步阐明从蓝绿藻到高等植物光合放氧的演化过程提供一些理论依据。

材料和方法

巨大螺旋藻（*Spirulina maxima*）藻种由德国Gottingen大学藻类研究中心提供。将藻种接种于含液体培养基的三角瓶中进行无菌培养，培养温度30℃，连续光照，接种两星期后即可取材进行实验。

藻细胞、类囊体膜的制备 根据Stewart A C.等[1]的方法加以改进。取生长两周的巨大螺旋藻5000mL,用布氏漏斗抽滤法收集藻体,并悬浮于200 mL冰冷处理过的缓冲液I[0.5mol／L-山梨醇, 5 mmol／L-$MgCl_2$, 5 mmlo／L-$CaCl_2$, 10 mmol／L-Hepes／NaOH(pH7.5), 0.5 mmol／L-Phosphate buffer (pH7.5)-(NaH_2PO_4), 0.5 mmol／L-EDTA]再抽滤收集并悬浮到冰冷处理的200 mL不含EDTA的缓冲液中,混匀,分装于6支50 mL的离心管中,冰浴及避光条件下用Labsonic 2 000探头超声波间歇匀浆破碎,选用频率为20kHz,每次处理1 min,共10次; 3 000×*g*冷冻离心5 min,收集上层蓝绿色溶液得到A液,置于冰浴于保存;再将沉淀悬浮于低渗的不含山梨醇及EDTA的缓冲液I中, 30 min后,冰浴下快速匀浆5—10 min,使其充分破碎, 200×*g*冷冻离心3 min,取出沉淀得到藻细胞,低温保存;收集上悬液得到B液; A, B液混合后,用4号纱蕊漏斗冰浴条件下抽滤以去除悬浮液中未破碎的藻细胞,滤液27 000×*g*冷冻离心15 min,收集沉淀,悬浮到冰冷的含有1 mol／L蔗糖, 10 mmol／L-NaCl, 5 mmol／L-$MgCl_2$, 50 mmol／L-Hepes(pH7.5), 5 mmol／L-$CaCl_2$的缓冲液II中,即获得具一定放氧活性的类囊体膜片层。

PSII颗粒的制备 根据Kazuhiko Satoh等[2]的方法加以改变。将提取的类囊体膜悬液（1mg chl／mL）按chl：Triton X-100＝1：10（W／W）加入一定量的Triton X-100，暗处冰浴温和搅拌30min，作用完毕后加入等体积的不含蔗糖的缓冲液II中，使得悬浮液蔗糖浓度为0.5 mol／L，然后在12 mL的超速离心管中，将0.5 mol／L蔗糖的类囊体膜悬浮液4 mL小心置于8 mL的缓冲液II上，构成0.5—1 mol／L的蔗糖不连续梯度。300 000×*g*超速冷冻离心1 h后,离心管中溶液从上到下被分成4个部分, C_1, C_2, C_3, C_4。C_1位于0.5 mol／L蔗糖中,呈浅黄色,其主要成分是藻胆蛋白。C_2位于0.5 mol／L和1 mol／L蔗糖中,呈蓝绿色, C_3位于1 mol／L蔗糖中呈绿色, C_4为膜碎片沉淀。取出C_2, C_3混合后再经300 000×*g*离心,沉淀即为具放氧活性的PSII颗粒。叶绿素浓度按Arnon方法进行测定。

PSII颗粒的盐洗及多肽重组

盐洗 参照Naktan H Y.[3]的方法改进。取具放氧活性的PSII悬浮液2 mL（2mg chl／mL），加入4 000mL的2 mol／L NaCl或1 mol／L $CaCl_2$,混匀, 4℃下避光温和搅拌30min, 300 000×*g*离心沉淀PSII颗粒,收集上悬液, -20℃保存,以备重组用。沉淀用缓冲液II洗涤1—2次, 300 000×*g*离心收集盐洗后的PSII颗粒。

多肽重组 主要参照Ghanotakis[4]方法。将盐洗后的PSII颗粒悬浮于经盐洗后收集的上悬液中，随后透析除盐。透析介质是缓冲液II，透析体积为样品的100倍，连续搅拌，每两小时更换一次透析介质，共换4次。透析后300 000×*g*离心沉淀PSII颗粒，并用缓冲液II清洗一次，再离心得PSII颗粒。

放氧活性的测定 使用薄膜氧电极法测定放氧活性。反应液组成见表1。

类囊体膜及PSII颗粒多肽组成分析 根据Laemli等[5]及美国Sigma公司提供方法改进。分子量的计算根据标准蛋白分子量，用回归法计算各多肽组分的分子量。

本实验所用生化试剂为Sigma公司生产，国产化学试剂均采用GR或AR级。

实验结果

藻细胞、类囊体膜、PSII 颗粒的放氧活性

对由实验中所制备的游离藻细胞、类囊体膜、PSII 颗粒分别进行了光合放氧活性的测定，其结果见表 1。

表 1 巨大螺旋藻的藻细胞、类囊体膜和 PSII 颗粒的放氧活性

Table 1 The O_2–evolution activity of cell, thylakoid membrane and PSII particle of *Spirulina maxima*

(O_2.μmol mg^{-1}chl h^{-1})

Cell	Thylakoid membrance	PSII Particle
16.02	42.17	95.79

Reaction mixture 2mL: Chl 100μg, 10mmol / L $MgCl_2$, 5mmol / L $CaCl_2$, 0.5mol / L Sucrose, 50mmol / L Mes–NaOH(pH 5.0 or pH 7.5), 3mmol / L $K_3Fe(CN)_6$, 3mmol / L DMBQ. Reaction conditions: 25℃, 30klx.

由表 1 可见，不同结构层次其光合放氧活性有明显差异，随着制备物的进一步纯化而活性逐步增强。

各种类型处理的 PSII 颗粒的放氧活性

为了探讨放氧活性与多肽组成的关系, 本实验对巨大螺旋藻具放氧活性的 PSII 颗粒进行了 NaCl 及 $CaCl_2$ 的洗涤处理及多肽重组, 经盐洗涤及重组后的放氧活性见表 2。

表 2 各种类型处理的 PSII 颗粒的放氧活性

Table 2 The O_2–evolution activity of PSII particles after different treatments (O_2.μmol mg^{-1}chl h^{-1})

Untreated	Washing by NaCl (2mol / L)	Washing by $CaCl_2$ (1mol / L)	Reconstitution after washing by NaCl
95.79	32.97	0	72.39

Reaction conditions and electron acceptors were the same as in Table 1.

由表 2 可见，经 2mol / L NaCl 盐洗后，同高等植物一样，巨大螺旋藻 PSII 颗粒的放氧活性大部分丧失，经过多肽重组后，放氧活性可得到部分恢复，这表明在巨大螺旋藻 PSII 颗粒复合物中也有类似于高等植物 23，17kD 功能的外在放氧蛋白的存在。经 1mol / L $CaCl_2$ 洗涤后结果同高等植物一样, 放氧活性完全丧失[6]。

类囊体膜及 PSII 颗粒多肽组成分析

根据 SDS–PAGE 图谱分析表明，巨大螺旋藻类囊体膜具有 20 条多肽，其中分子量最大的多肽为 109kD，其次是 98kD，最小的为 9kD，组分复杂，它包含 PSI，PSII 以及藻胆体的部分蛋白（图 1：A)， PSII 颗粒多肽组分包含 87，74，55，50，45，42，33，26，23，17，15，11kD 等 12 条多肽（图 1：B，图 2：A)，这与高等植物有明显的差异。

盐洗后的 PSII 颗粒的多肽组成

经 2mol / L NaCl 盐洗后，55，50，26kD 多肽均有不同程度的减少，这些多肽被部分洗脱掉（图 2：B)，放氧活性随着也明显下降（表 2)；而经 1mol / L$CaCl_2$ 处理后, 除了 50kD 多肽减少外, 55, 26kD 则完全被洗脱(图 2: C), 此时放氧活性也完全丧失(表 2)。

讨 论

Stewart 等[7]用嗜温蓝绿藻组囊藻 *Phormidium laminosum* 为材料, 最先制备出具较高放氧活性的 PSII 颗粒。此后，以高等植物及嗜温蓝绿藻的高放氧活性的 PSII 颗粒为材料，经进一步纯化，均已获

得高纯度的PSII颗粒制备物及反应中心复合物，这就进一步探索PSII放氧复合物的多肽组成及这些多肽在光合放氧过程中的功能打下基础。目前，对高等植物中有关光合放氧的外在蛋白33，23，17kD3个多肽在放氧过程中的作用，已取得较为一致的观点[8]。国外对组囊藻 *Phormidium laminosum*[9]，栅列藻 *Anacystis nidulans*[10] 及聚球藻 *Synechococcus*. sp.[11,12] 3种嗜温藻的放氧复合物特性及多肽组成进行了研究，但对在常温下生长的蓝绿藻的放氧多肽组分研究则较为鲜见，究其原因，就是在制备PSII放氧复合物过程中，其放氧活性极易丧失。根据我们的实验尝试，从这一类藻中制备具较高放氧活性的PSII颗粒必须具备以下几个条件：1）严格低温条件。严格保持在低温（0—4℃）下操作是制备PSII颗粒有无放氧活性的关键；2）Ca^{2+}的存在。若在制备介质中降低或缺乏Ca^{2+}的含量，则导致放氧活性的降低或丧失；3）山梨醇、蔗糖等保护物质的存在；4）适当的增溶剂的比例。用适当浓度的Triton X-100处理类囊体膜（Triton X-100∶chl＝10∶1, W／W），可使得制备的PSII颗粒保持较高的放氧活性，该比例远远低于高等植物中制备PSII颗所用的Triton X-100的比例。

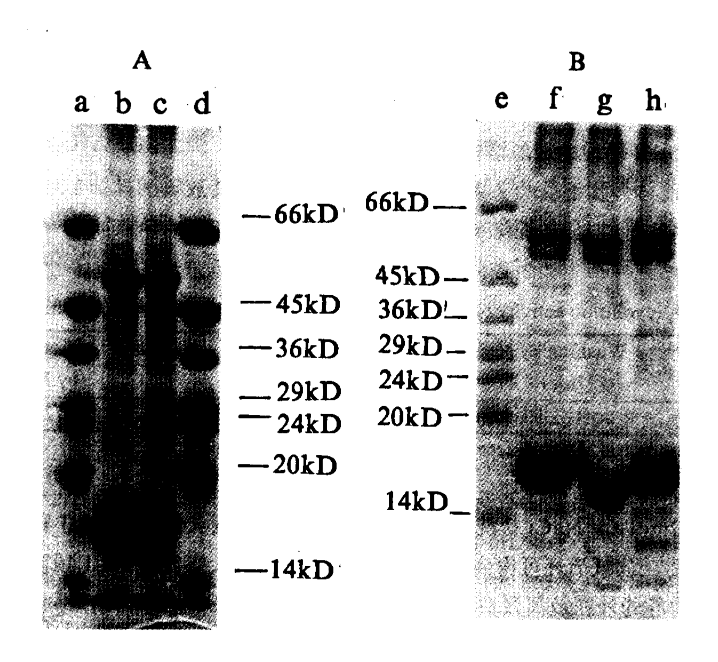


图1 巨大螺旋藻类囊体膜及PSII颗粒SDS-PAGE电泳图谱

A. 类囊体膜：a,d. 标准蛋白分子量标记；b,c. 类囊体膜多肽；B. PSII：e. 标准蛋白分子量标记；f,g,h. PSII多肽.

Fig. 1 Polypeptide patterns, obtained by SDS-PAGE of thylokoid membranes and PSII particles from blue-green alga *Spirulina maxima*. A. Polypeptide patterns of thylakoid mambranes: a,d. Molecular weight markers; b,c. Thylakoid membranes; e. Molecular weight markers; f,g,h. PSII particles.

巨大螺旋藻（*Spirulina maxima*）类囊体膜及其PSII颗粒的多肽组成分析未见报道。根据本实验结果，其多肽组分复杂。参照对盐泽螺旋藻胆体以及对藻胆体组分的分析[13,14]，我们认为在巨大螺旋藻类囊体膜组分中，大分子量的多肽可能起着连接藻胆体和类囊体膜的"锚蛋的"（anchor protein）的作用，并作为末端能量受体，至于小分子量的多肽可能是藻胆白的亚单位。此外组分中还包含PSI的组分。

根据盐洗及多肽重组的实验结果，巨大螺旋藻具放氧功能的PSII复合物多肽组分中，55，50，26kD多肽可能与光合放氧相联系，特别是55，26kD的存在与否，直接影响放氧活性，很可能是放氧蛋

表 3 巨大螺旋藻与嗜温蓝绿藻的 PSII 多肽组分和放氧的外在蛋白组分差异

Table 3 The comparison of polypeptides composition of PSII particles and extrinsic oxygen-evolving proteins between *Spirulina maxima* and thermophilic blue-green algaes.

	PSII 颗粒多肽组分(kD) Polypeptides (kD) of PSII particles	外在放氧蛋白 (kD) Extrinsic oxygen-evolving protein (kD)
巨大螺旋藻 *Spirulina maxima*	87,74,55,50,45,42,33, 26,23,17,15,11	55,50,26
组囊藻 * *Phormidium laminosum*	87,83,68,57,48,46,42,40,38,34, 32,30,27,18,15,14,10	9(Stewart A C.1981) [7]
栅列藻 * *Anacystis nidulans*	77,60,40,36,33,27,20,15,14,10	36,33,30 (England R R. 1983) [10]
聚球藻 * *Synechococcus* sp.	47,40,35,31,28,9,8	35 (Kazuhiko Satoh 1985) [12]

*嗜温蓝绿藻 *Thermophilic blue-green algae.

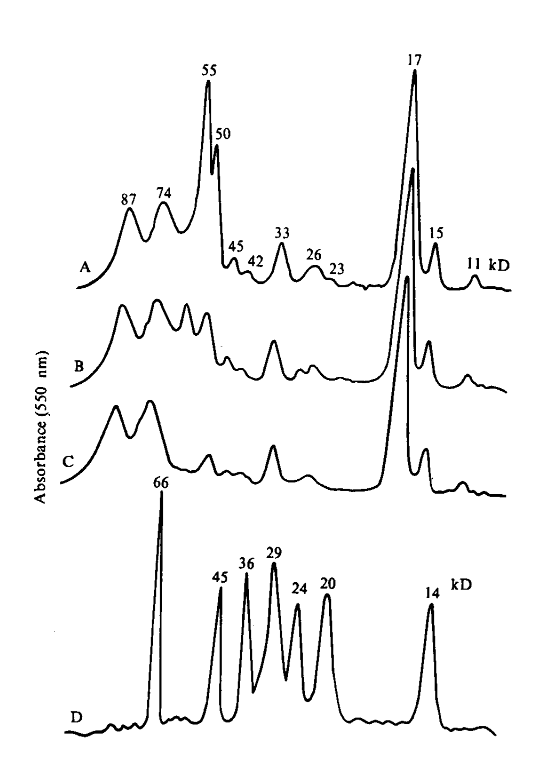


图 2 巨大螺旋藻 PSII 颗粒经各种处理后多肽组分的光密度扫描图. A. 对照, B. 2mol/L NaCl 处理, C. 1mol/L $CaCl_2$ 处理, D. 标准蛋白的分子量标记.

Fig. 2 Densitometer scanning of SES-PAGE polypeptides of PSII particles in *Spirulina maxima* treated with NaCl and $CaCl_2$. A. Control, B. Treated with 2mol/L NaCl, C. Treated with 1mol/L $CaCl_2$, D. Molecular weight markers.

白复合物中外在蛋白的主要成分。除上述多肽外，其它组分的功能尚难以确定，可能除含有 PSII 作用中心的多肽组分外，还有放氧所必需的内在蛋白组分。

根据对巨大螺旋藻的实验结果，对照前人所研究的嗜温蓝绿藻，其 PSII 多肽组分和放氧复合物的外在蛋白均存在较大差异，似乎常温下生长的巨大螺旋藻 PSII 组分更接近于组囊藻，这与两种藻在分类地位上相近是一致的。但由于其生长环境的差异，二者放氧复合物的外在蛋白仍具较大差异（表 3)。

与真核绿藻栅藻和高等植物菠菜相比较，巨大螺旋藻 PSII 组分及与放氧有关的外在蛋白组分也同样存在着较大的差异。栅藻突变体的 PSII 多肽组分包括 8 条多肽，其中 34, 19, 16kD 与放氧有直接联系 [15], 菠菜 PSII 多肽组分有 33, 23, 17kD 3 个外在放氧蛋白 [16]。可见与真核光合生物相比较, 巨大螺旋藻(*Spirulina maxima*)的 PSII 多肽除组分复杂, 特别是有 87, 74kD 的大分子量多肽, 外在的放氧蛋白分子的大小的数量也具很大差异, 这可能与其较原始的进化地位相联系。

根据以上实验结果及分析, 我们可得出以下结论: 1)常温下培养的巨大螺旋藻(*Spirulina maxima*)在特定的条件下, 可获得具较高放氧活性的 PSII 复合物。2) 巨大

螺旋藻PSII多肽组分与高等植物、真核绿藻及其它嗜温蓝绿藻相比较，存在着较大的差异。3）在巨大螺旋藻PSII多肽组分中，55，50，26kD多肽可能与放氧相联系，特别是55，26kD是放氧所必不可少的，它们类似于高等植物33kD的功能。对巨大螺旋藻放氧多肽的深入研究，有助于进一步阐明从原核蓝绿藻到高等植物光合放氧的演变过程。但由于其结构组分的原始性和复杂性，更深入地了解其光合放氧的机理，有待于进一步完善分离制备技术，制备出更纯的最小结构单位的光合放氧复合物及PSII作用中心。

参考文献

〔1〕Stewart A C, Bendall D S. Properties of oxygen-evolving photosystem II particles from *Phormidium laminosum*, a thermophilic blue-green algae. *Biochem J*, 1981, **194:** 877—887.

〔2〕Kazubiko Satoh, Sakae Katoch. A functional site of Ca^{2+} in the oxygen-evolving photosystem II from *Synechococcus sp. FEBS Letter*, 1985, **190:** 199—203.

〔3〕Nakatani H Y. Photosynthetic oxygen-evolution does not require the participation of polypeptides of 16 and 24kD. *Biochem Biophys Res Communs*, 1984, **120:** 299—304.

〔4〕Ghanotakis D F, Topper J N, Babcock G T *et al.* Water-soluble 17, 23kD polypeptides restore oxygen evolution activity by creating a high-affinity binding site for Ca on the oxyclizing side of photosystem II. *FEBS Letters*, 1984, **170**(1): 169—173.

〔5〕Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature*, 1970, **227:** 680—685.

〔6〕李功藩, 吴亚君, 刘 冬等. 光系统Ⅱ颗粒的多肽组成分析和重组后的放氧活性. 植物生理学报, 1987, **13**(4): 344.

〔7〕Stewart A C, Bendall D S. Preparation of an active, oxygen-evolving photosystem II particle from a blue-green algae. *FEBS Letters*, 1979, **107:** 308—311.

〔8〕Ghanotakis D F, Yocum D F. Polypeptides of photosystem II and their role in oxygen evolution. *Photosynthesis Research*, 1985, **7:** 97—114.

〔9〕Stewart A C, Martin Siczkowski, Ljumgber U. Glycerol stabilizes oxygen-evolution and maintains binding of a 9 kD polypeptide in photosystem II particles from the cyanobacterium, *Phormidium laminosum. FEBS Letters*, 1985, **193:** 175—179.

〔10〕England R R, Evans E H. A requirement for Ca in the extraction of O_2-evolving photosystem II preparations from the cyanobacterium *Anacystis nidulans. Biochem J*, 1983, **210:** 473—476.

〔11〕Takashi Ohno, Kazuhiko Satoh, Sakae Katoh. Chemical compositiion of purified oxygen-evollving complexs from the thermophilic cyanobacterium *Synedhococcus sp. B B A*, 1986, **852:** 1—8.

〔12〕Kazuhiko Satoh, Takashi Ohno, Sakae Katoh. An oxygen-evolving complex with a simple subunit structure-′a water-plasto quinone oxidoreductase′-from the thermophilic *Synedhococcus sp. FEBS Letters*, 1985, **180**, 326—330.

〔13〕刘其芳, 王后东, 张宪孔. 盐泽螺旋藻藻胆体的分离和特性. 植物生理学报, 1988, **14**(2): 113—116.

〔14〕Glazwe A N. Phycobilisome: a micromolecular complex optimized for light energy transfer. *B B A*, 1984, **768:** 29.

〔15〕Bishop N I. Identification of photosystem-II thylakoid proteins through mutational analysis with Chlamydomonas and Scenedesmus phenotypes. IN: Yorinao Inoue. et al. (ed) The Oxygen Evolving System of Photosynthesis. Academic Press, Inc. 1983, **210:** 473—476.

〔16〕Ghanotakis D F, Waggoner C M, Bowlby N R *et al.* Comparatice structural and catalytic properties of oxygen-evolving photosystem II prearations. *Photosynthesis Research*, 1987, **14:** 191—199.